动 物 学 研 究 2005, Oct. 26 (5): 499-505 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

表皮生长因子和胰岛素对大熊猫体外培养皮肤成纤维细胞生物学特性的影响

张 明[1], 侯 蓉[2], 刘玉良[2], 郑鸿培[1], 朱 庆[1,*], 张志和[2], 鲜 红[1]
(1. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 雅安 625014; 2. 成都大熊猫繁育研究基地, 四川 成都 610081)

摘要: 用DME:Ham's F12 (1:1) 培养液, 添加3个水平的表皮生长因子和2个水平的胰岛素, 组合成6种培养体系 (CS) 分别培养大熊猫皮肤成纤维细胞。通过对细胞生长速度和染色体数目变异率进行测定, 测得在添加10 μg/mL的胰岛素和40 ng/mL的表皮生长因子的培养体系 (CS-5) 中: 以 $(1.673 \pm 0.185) \times 10^5$/mL密度接种细胞, 经3.5 d, 密度达到 6.890×10^5/mL, 其生长速度最快; 染色体数目为二倍体细胞的比率75.77%; 核型分析显示, 培养的细胞是大熊猫体细胞。综合衡量, CS-5更适合大熊猫皮肤成纤维细胞的培养。

关键词: 大熊猫; 成纤维细胞; 培养体系; 表皮生长因子; 胰岛素
中图分类号: Q952.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2005) 05-0499-07

Effects of Epidermal Growth Factor and Insulin on Biological Characteristics of Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) Cutaneous Fibroblast *in Vitro*

ZHANG Ming[1], HOU Rong[2], LIU Yu-liang[2], ZHENG Hong-pei[1], ZHU Qing[1,*], ZHANG Zhi-he[2], XIAN Hong[1]
(1. *College of Science & Technology of Animal, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;*
2. *Giant Panda Breeding Research Base in Chengdu, Chengdu 610081, China*)

Abstract: Six culturing systems were designed by adding different concentrations of epidermal growth factor (EGF) and insulin into DME/Ham's F12 medium. Based on the speed of cell growth and variation ratio of chromosome number, we chose the best culture media from the six culture systems. The results showed that the culture medium of 10 μg/mL insulin and 40 ng/mL EGF was most suitable for giant panda's cutaneous fibroblast culture *in vitro*. In the best culturing system, the density of fibroblast increased from $(1.673 \pm 0.185) \times 10^5$/mL to 6.890×10^5/mL for three and a half days. The fibroblast growing speed was the fastest in all culture system and the ratio of diploid at the 5th generation was 75.77%. Karyotype analysis showed that culture cell is from Giant Panda's body cell. In conclusion, CS-5 is more suitable for giant panda's cutaneous fibroblast culture than other culturing systems *in vitro*.

Key words: Giant panda; Fibroblast; Culture system; Epidermal growth factor; Insulin

大熊猫是世界珍贵的哺乳动物, 但由于其繁殖力低、栖息地不断缩小, 野生种群的数量不断减少 (Feng et al, 1991)。大熊猫具有宝贵的遗传研究价值, 其遗传资源保护研究刻不容缓。通过细胞培养建立的大熊猫细胞库与其配子库及胚胎库一起, 形成多层次、多角度的遗传资源保藏系统 (Gilmore et al, 1998); 同时, 培养的细胞可以为全世界的研究者提供丰富的研究材料, 有利于大熊猫保护的世

收稿日期: 2005-02-22; 接受日期: 2005-06-30
基金项目: 成都大熊猫繁育研究基金 (2001003)
* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhuqing5959@vip.163.com
第一作者简介: 张明 (1975-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事动物繁殖生物技术相关研究。

界性联合研究。已有研究（Liu et al，1999；Han et al，2001）显示，成年大熊猫皮肤成纤维细胞的培养较幼体难，并且采用普通培养体系培养又难以成功。我们前期预备试验初步表明，幼仔大熊猫的皮肤成纤维细胞体外培养比较容易，年龄在10岁以上的大熊猫，皮肤成纤维细胞体外培养的增殖比较缓慢。

在细胞培养中，细胞因子和激素的添加，主要应用在非分泌型细胞的无血清培养体系，或者有血清或无血清培养的分泌型细胞培养体系，以及培养过程中生长缓慢、难培养细胞的培养体系中（Bottenstein & Sato，1979；Martha，1984）。本研究通过添加不同水平的表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）和胰岛素，观测其对大熊猫皮肤成纤维细胞生长以及遗传稳定性方面的影响，来优化培养体系，以实现对老龄大熊猫皮肤成纤维细胞的培养，建立大熊猫个体遗传资源细胞系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来自成都大熊猫繁育研究基地的0.5~8岁大熊猫共18只。大熊猫麻醉后，股内侧剃毛、清洗消毒（碘酒消毒后立即用75%的酒精脱碘）后，用9~12号针头挑起皮肤，再按与针尖垂直的方向切割挑起的皮层，每块皮肤约2~3 mm^2，然后迅速将其放入含500 IU/mL青霉素500 μg/mL和链霉素（长征制药二厂）的PBS液中（自配制），4 ℃下保存备用，保存时间不得超过48 h。

1.2 试验方法

1.2.1 皮肤组织细胞的分离 将大熊猫皮肤组织在含100 IU/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的Hank's液（HyClone，AME16016）中洗涤3次，每次浸5 min后120×*g*离心沥干。用电子天平称重皮肤组织块，然后在4 ℃下用200 IU/mL的胶原蛋白酶I（Gibco BRL，1021082）持续酶解36~48 h。酶解过程中随时观察，待皮肤组织呈絮状时停止酶解。细胞悬液洗涤后用血球计数法测量细胞密度，计算细胞得率。并将所有熊猫个体酶解的细胞混合，制成细胞样品池。

1.2.2 细胞培养 在DME:Ham's F12（HyClone，AME15751）培养液中添加100 IU/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、5 μg/mL两性霉素B（Sigma，17135）、5 μg/mL M-Plasmocin™（InvivoGen，晶美分装，24-103-MPP）和2 mmol/L L-Glu（Gibco BRL，1062503）组成基础培养液，然后在基础培养液中添加不同剂量的胰岛素（Sigma，I5500）和EGF（InvivoGen，1120677），组成6种培养体系（表1）。原代培养液中添加20% FBS（HyClone，AKB11420），传代培养液中添加10% FBS。

表1 本研究所采用的6种培养体系

Tab. 1 The six kinds of culture system in the studies

培养体系 Culture system	基础培养液 Basical culture system	胰岛素 Insulin (μg/mL)	表皮生长因子 Epidermis growth factor (ng/mL)
CS-1	1) DME/Ham F12 (1:1)	0	0
CS-2	2) 100 IU/mL 青链霉素	0	40
CS-3	3) 5 μg/mL 两性霉素 B	0	80
CS-4	4) 5 μg/mL M-Plasmocin™	10	0
CS-5	5) 2 mmol/L L-Glu	10	40
CS-6		10	80

培养时，将酶解获得的细胞用培养液调整浓度到2~4×10^5个/mL，每个75 mL培养瓶（Falcon，353014）中添加2 mL，静置6 h后再添加相应培养液3 mL。每2天更换2/3的培养液，当细胞汇合铺满瓶底80%时，用0.25%胰蛋白酶（Gibco BRL）消化脱壁传代。

1.2.3 细胞生长速度测定和生长曲线绘制 取传至第6代的细胞，按（1.673±0.1850）×10^5/mL，每孔0.5 mL接种细胞到12孔板培养板（Falcon，353043），然后每隔12 h消化1孔，测定细胞个数，8个重复。

1.2.4 染色体数目变异率测定 分别取6种培养液中的第5代细胞，用秋水仙碱(Sigma,31K1534)处理后进行核型制片(Wang & Cheng,1989),并将核型片制作成临时装片。

分析每种培养体系中的80~100个细胞的核型，根据细胞染色体数目（N），将其分成亚单倍体（$n<21$）、单倍体（$n=21$）、亚二倍体（$21<n<42$）、二倍体（$n=42$）、超二倍体（$42<n<63$）和多倍体（$n\geq63$）6种类型，并分别计算每种类型细胞所占的百分比，通过染色体数目变异率测试，衡量细胞在不同培养体系中的遗传特性。

1.3 统计分析

用方差分析（*F*检验）和χ^2检验对数据进行统计分析。

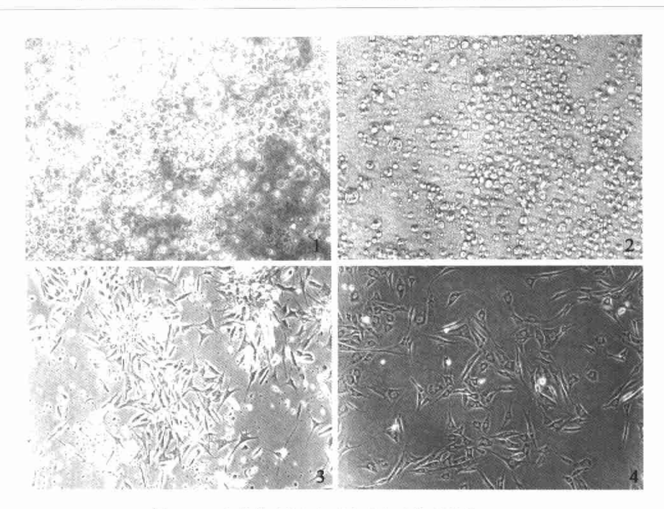


图 1—4　大熊猫皮肤组织酶解和细胞培养结果（×100）

Figs. 1－4　Enzyme digestion of Giant Panda's skin tissue and cultured fibroblasts（×100）

1. 酶解后得到的细胞悬液（Suspended cell after skin-tissue being digested with enzyme）；
2. 经过简单处理的细胞悬液（Suspended cell liquid by simple treatment）；
3. 原代接种的皮肤组织分离细胞（Original culture cell from skin tissue being digested）；
4. 传到第3代的皮肤成纤维细胞（No. 3 generation fibroblast）。

2　结果与分析

2.1　大熊猫皮肤组织酶解及细胞得率

由于大熊猫年龄和组织块大小的差异，酶解分离时间一般需要 36～48 h。酶解后的皮肤组织呈絮状悬浮物，其中最上层为非细胞悬浮物，紧接着是单细胞层，中层为细胞团，最下层为毛根和未被消化的皮肤表层。酶解所得的细胞悬液经离心洗涤，取中层悬液，其他非细胞成分含量会大大减少（图1、2）。大熊猫皮肤组织酶解分离的细胞平均得率为 5.079×10^6 个/g。

2.2　细胞培养

培养中发现，原代细胞的贴壁速度往往比传代细胞慢。通过相差显微镜（Olympus, IX-70, Japan）观察发现，原代培养物中往往混有其他类型的细胞（图3），经过2次传代后，通过形态观察，培养细胞主要为成纤维样细胞（图4）。

2.3　细胞生长速度

用血球计数法测量细胞密度，计算每孔细胞个数，所得的数据见表2。

最大细胞个数的 CS 培养体系的顺序是：CS-4（69.86）＞CS-5（68.90）＞CS-3（65.73）＞CS-6（56.74）＞CS-2（55.58）＞CS-1（53.14），其中 CS-4、CS-5 与 CS-6、CS-2、CS-1 之间差异显著（$P<0.05$，F 检验）；细胞生长最先达到峰值的 CS 培养体系是 CS-5（84 h）和 CS-2（84 h），然后依次是 CS-1（96 h）、CS-4（108 h），最后是 CS-3（120 h）和 CS-6（120 h）。

CS-1 培养体系细胞达到平台期经历的时间（96 h）比 CS-2、CS-3、CS-4、CS-5 和 CS-6（84 h）长；其 72～120 h 的细胞个数的变异系数为 33.19%。CS-2、CS-3、CS-4、CS-5、CS-6 培养体系 72～120 h 的细胞个数变异系数分别为 7.20%、14.45%、9.11%、7.40% 和 10.72%，与 CS-1 的差异显著。主要原因是达到平台期后，CS-1 培养体系中细胞数量很快减少，而 CS-2、CS-3、CS-4、CS-5、CS-6 的平台期维持较长（36 h）。在平台期内，CS-2 中细胞的数量呈缓慢下降趋势，而 CS-3、CS-4、CS-5、CS-6 中细胞数量波动较小。

2.4　染色体数目变异率分析

将CS培养细胞进行核型制片，分析每种培养体系中80~120个细胞的核型，算出每种类型的百分率见表3。

6种CS培养体系中的二倍体染色体百分率差异不显著（$P>0.05$，χ^2 检验），但CS-1、CS-2、CS-4、CS-5中的二倍体细胞百分率比CS-3、CS-6略高，CS-5中二倍体细胞百分率最高。

2.5 核型分析

将CS-5培养的大熊猫皮肤成纤维细胞进行核型分析，确定细胞的种属特性。对7个核型正常、染色体比较清晰的细胞染色体进行放大、测量、统计、分组、编号，将染色体的相对长度和着丝粒指数与大熊猫染色体组型（Chen et al，1991）进行比较，数据见表4。

培养细胞的染色体众数为42，与大熊猫正常核型的染色体数目一致。经配对试验 t 检验，染色体相对长度的测量值与理论值之间差异不显著（$P>0.05$），染色体着丝粒指数测量值和理论值之间差异显著（$P<0.05$）。根据着丝粒指数确定的染色体类型中，第9、10号染色体测量类型为中部着丝（m），理论类型为亚中部着丝（sm），这种差异可能主要由测量误差引起，但也不排除9、10号染色体结构变异的可能性。

大熊猫染色体组型见图5。

3 讨 论

3.1 EGF对成纤维细胞生长的影响

EGF是细胞广谱的促分裂剂，能促进细胞DNA、RNA、蛋白质以及大分子物质的合成，能够增加细胞内外物质的转运(Ding & Lan，2001；Song & Fang，2002)。在细胞培养中，EGF常作为一种促进细胞增殖的添加物。在鸡角膜缘上皮细胞、人结膜上皮细胞、真皮成纤维细胞、牙周膜细胞(PDLCs)的培养研究中表明：EGF能够促进细胞的增殖，但促进细胞的增殖能力与细胞的种类、EGF的浓度有关(Hou et al，2002；Wang et al，

表2 大熊猫皮肤成纤维细胞在6种培养体系中的细胞个数（10^4 个/孔）

Tab. 2 Cell numbers under different insulin and EGF culture system（10^4/hole）

培养体系 Culture system	培养时间 Culture time（h）										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
CS-1	16.73	13.90	16.49	21.91	28.28	40.06	37.47	45.13	53.14^{P}	34.05	19.65
CS-2	16.73	12.15	13.75	20.17	27.96	30.02	52.02	55.58^{P}	55.35	53.40	46.29
CS-3	16.73	13.56	12.66	18.10	30.29	40.92	44.54	61.61	60.03	64.66	65.73^{P}
CS-4	16.73	13.50	19.67	28.47	25.83	49.60	57.09	61.64	57.97	69.86^{P}	67.69
CS-5	16.73	12.29	22.01	24.30	29.73	42.31	60.89	68.90^{P}	60.89	56.61	61.18
CS-6	16.73	14.02	20.67	21.40	29.03	32.72	43.92	55.11	46.99	53.14	56.74^{P}

^{P}表示在测试过程中生长达到的最大细胞个数（The largest cell numbers during cell growth）。

表3 6种培养体系中培养5代后大熊猫成纤维细胞染色体数目的变异率

Tab. 3 Variation percent of chromosome number of Giant Panda's fibroblast in six kinds of culture system on the fifth passage

培养体系 Culture system	染色体数目百分率 Percent of chromosome number（%）						波动范围 Variable range	众数 Most number
	亚单倍体 Subhaploid	单倍体 Haploid	亚二倍体 Subdiploid	二倍体 Diploid	超二倍体 Hyperdiploid	多倍体 Multidiploid		
CS-1	1.22	1.22	21.70	73.41	2.44	—	16-57	42
CS-2	2.63	—	20.26	74.45	2.63	—	17-52	42
CS-3	1.69	—	15.42	69.32	3.39	10.17	13-86	42
CS-4	2.65	—	16.36	72.38	2.28	1.20	15-49	42
CS-5	2.90	1.45	16.09	74.77	4.80	—	15-49	42
CS-6	—	1.22	20.49	67.32	2.44	8.54	21-76	42

—：表示该种类型在统计中不存在（No such type）。

表 4　大熊猫染色体相对长度和着丝粒指数

Tab. 4　Relative length and centromere index of Giant Panda chromosome

染色体编号 Chromosome No.	染色体类型 Chromosome type		相对长度 Relative length		着丝粒指数 Centromere index	
	测试 Experiment	对照* Contrast*	测试值 Experimental value	对照值* Contrast value*	测试值 Experimental value	对照值* Contrast value*
1	m	m	8.267±0.5827	8.04±0.085	45.353±3.6065	46.95±0.629
2	m	m	7.573±0.6209	7.66±0.163	41.770±2.4022	43.41±0.704
3	m	m	6.703±0.4371	6.62±0.127	40.123±2.5515	45.12±0.680
4	m	m	6.028±0.1890	6.12±0.110	39.128±3.8576	43.28±0.759
5	sm	sm	5.870±0.2837	5.58±0.108	31.508±6.4097	31.84±0.846
6	m	m	5.690±0.1867	5.77±0.081	38.960±7.2267	45.75±0.740
7	sm	sm	5.623±0.2644	5.47±0.107	35.405±9.3117	32.22±0.783
8	m	m	5.278±0.3309	5.22±0.121	42.163±1.7286	41.25±0.664
9	m	sm	5.048±0.1795	4.92±0.101	38.953±6.5401	36.03±0.693
10	m	sm	4.935±0.2417	4.92±0.069	39.233±5.4297	35.64±0.654
11	m	m	4.578±0.2250	4.62±0.082	41.955±6.1389	42.98±0.627
12	m	m	4.410±0.0337	4.44±0.089	44.718±5.8815	45.12±0.915
13	m	m	4.228±0.0450	4.36±0.074	42.620±4.6619	43.34±0.531
14	m	m	4.120±0.1334	4.14±0.060	43.243±6.3802	45.89±0.709
15	m	m	3.870±0.1538	3.90±0.074	42.145±2.8635	42.78±0.683
16	m	m	3.720±0.2364	3.76±0.058	43.293±4.1430	45.98±0.731
17	—	—	2.780±0.6810	3.54±0.150	—	—
18	—	—	2.253±0.4556	2.13±0.047	—	—
19	—	—	1.843±0.1706	1.90±0.047	—	—
20	—	—	1.618±0.2238	1.79±0.036	—	—
X	m	m	5.353±0.2598	5.51±0.083	42.668±5.0600	40.36±0.606
Y	—	—	1.260±0.0577	—	—	—

*来自 Chen et al（1991）[From Chen et al（1991）]。

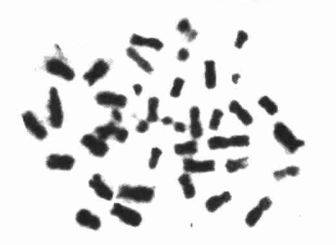


图 5　大熊猫染色体组型（雄）

Fig. 5　Giant Panda's karyotype (male)

2001；Wang et al，2002；Lü et al，2002）。在大熊猫皮肤成纤维细胞培养体系中添加 EGF，可能有利于细胞的增殖，对于老龄大熊猫皮肤成纤维细胞的培养有利。

在本研究中，发现 EGF 有促进大熊猫皮肤成纤维细胞体外增殖的能力，而且 80 ng/mL 组（65.73）细胞的增殖数量高于 40 ng/mL 组（55.58），说明 EGF 对细胞的增殖作用存在剂量依赖性，但差异不显著。这种原因可能由于 40、80 ng/mL 两个水平浓度差异太小，不足以引起大熊猫

皮肤成纤维细胞增殖的显著变化；也可能因为两个水平的浓度太低或太高，处于EGF剂量效应的边缘区。在添加了EGF的培养体系中，大熊猫皮肤成纤维细胞数量在平台期呈现波动变化，平台期的维持延长，这种变化可能与换液间隔有关；同时EGF的作用是通过促进细胞周期蛋白cyclinD1和CDK-4的表达，进而使细胞G1期缩短来促进细胞增殖的（Song & Fang，2002），这种作用本身具有周期性。

3.2 胰岛素对成纤维细胞生长的影响

胰岛素可促进细胞对葡萄糖的利用。在细胞培养中，胰岛素有促进细胞增殖的作用（Zhu，1997）。本研究中，通过对CS-1和CS-4比较表明：胰岛素能明显促进大熊猫皮肤成纤维细胞的体外增殖；在添加了胰岛素的培养体系中，大熊猫皮肤成纤维细胞生长的平台期延长。

3.3 EGF和胰岛素对成纤维细胞生长的共同作用

胰岛素和EGF同时使用时：在低剂量EGF下，胰岛素和EGF促进细胞增殖的能力存在累加作用；在高剂量EGF下，胰岛素和EGF表现出对大熊猫皮肤成纤维细胞体外增殖的抑制作用。由此可以说明，细胞的增殖潜力除受胰岛素和EGF浓度影响外，还受细胞内在因素控制，细胞的增殖潜力存在极限。EGF和胰岛素与受体结合后，引起各自受体上酪氨酸磷酸化，通过酪氨酸激酶途径引起细胞内的生物效应（Ding & Lan，2001；Song & Fang，2002；Zhu，1997；Deng & Zhang，1998；Ray et al，1981；Gianetto & Griswold，1979）。在胰岛素和EGF的作用下，二者竞争酪氨酸激酶信号通路中的公用信号转导蛋白质，从而使大熊猫皮肤成纤维细胞的增殖不表现累加作用，甚至表现抑制作用。在胰岛素和EGF共同作用下，酪氨酸激酶信号通路中的公用信号转导蛋白质的数量制约着细胞的增殖潜力。通过对CS-1、CS-2和CS-4的分析表明：10 μg/m的胰岛素引起细胞的增殖能力大于40 ng/mL的EGF引起细胞的增殖能力。

在未添加胰岛素和EGF的CS-1中，细胞的增殖速度，增殖峰值明显小于其他组，平台期的维持时间也明显短于其他组。在所有培养体系中，细胞生长周期可明显分为潜伏期、指数生长期、平台期和衰退期，其中各培养体系在潜伏期、指数生长期差异不明显。平台期开始出现差异，CS-1培养体系平台期很短，很快进入衰退期，而其他培养体系有相对较长的平台期。这与胰岛素和EGF促进细胞增殖的潜能相关。

3.4 培养细胞遗传稳定性评估

作为遗传资源保存的细胞系，遗传稳定性是极其重要的。发生高度变异的细胞系，既失去了细胞原有的生物学特性，也失去了遗传资源保存的意义。体外培养的细胞发生突变后，极少的细胞丧失增殖能力，大部分细胞变异后仍能够分裂增殖，从而使培养细胞的可遗传变异不断积累加剧，最终造成细胞系的分化（Gianetto & Griswold，1979），由于培养过程中的自然分化，很多细胞系根据遗传物质的差异可以分成更多的细胞株（Zhang et al，2001）。因此细胞的体外培养过程也是一个细胞变异积累，产生分化的过程。Zhang et al（2001）在研究7种动物的肾细胞（F-18、CRFX、CKF、MDCK、Vero、Vero-2、MA-104、BHK-21）和Hela细胞系中若干细胞株的染色体变异率、克隆形成率和肿瘤形成的相互关系时发现：体外培养的细胞系，染色体数目变异是普遍现象，其变异的程度不仅与细胞系（株）自身特性有关，还与培养体系、方法和传代次数有关。寻找尽可能维持培养细胞遗传稳定性的培养体系，对于遗传资源细胞系的培养非常重要。

添加EGF和胰岛素，对大熊猫皮肤成纤维细胞的遗传变异是否产生影响？研究中发现：高浓度的EGF可引起多倍体细胞的比率上升，从而相应减少正常二倍体细胞的比率，但与其他组差异不显著。这种现象可以用机体中EGF和EGFR过度表达引起的肿瘤易发性和肿瘤高移除率进行解释（Panelman et al，1990）：在体条件下，EGF的过量，使细胞核裂加快，容易引起染色体数目和结构的变异，这种变异导致细胞瘤变，但瘤变细胞激发机体免疫系统清除瘤变细胞、EGF和EGFR过度表达的细胞，从而表现出肿瘤的高移除率；而在体外培养中，高浓度引起的多倍体变异细胞无法被清除，从而导致多倍体细胞增加。此外，还可能与形成的核分裂相重叠，影响观察有关。对6种培养体系的细胞染色体数目变异率分析表明，胰岛素对体外培养的大熊猫皮肤成纤维细胞的染色体变异率没有影响。

在EGF和胰岛素这两种促进大熊猫皮肤成纤维细胞增殖的物质中，胰岛素是更理想的促进细胞增殖的添加物。在已经建立的CS培养体系中，从

促进细胞生长增殖速度上考虑，CS-5、CS-4、CS-3比较适合大熊猫皮肤成纤维细胞的生长，其中CS-5最适合；从生长速度和染色体数目变异率分析综合考虑，CS-5比较适合大熊猫皮肤成纤维细胞的培养。更加优化的大熊猫皮肤成纤维细胞培养体系可以不添加EGF，只添加胰岛素。

为了深入研究EGF和胰岛素对大熊猫皮肤成纤维细胞生物特性的影响，可以采用2D-PAGE和DD-PCR技术，研究不同浓度EGF和胰岛素作用于大熊猫皮肤成纤维细胞引起的蛋白质和ESTs的差异。

致谢：本研究在中国野生动物遗传资源保护与繁育研究重点实验室完成，并得到成都大熊猫繁育基金会的资助；美国国立癌症研究中心亚洲濒危猫科动物遗传资源保护研究课题组也给予帮助，一并致谢！

参考文献：

Bottenstein JE, Sato GH. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium [J]. *Proc Natl Acad Sci*, **76**: 514-517.

Chen DY, Wang XZ, Wang ZS. 1991. The karyotype of giant panda [A]. In: A study on bredding and disease of the giant panda [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Publishing Limited, 189-193. [陈大元，王喜忠，王子淑. 1991. 大熊猫染色体组型. 见：大熊猫繁殖与疾病研究. 成都：四川科学技术出版社，189-193.]

Chen DY, Wang XZ, Wang ZS. 1991. Study on the banded chromosomes of he giant panda [A]. In: A study on bredding and disease of the giant panda [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Publishing Limited, 194-201. [陈大元，王喜忠，王子淑. 1991. 大熊猫显带染色体研究. 见：大熊猫繁殖与疾病研究. 成都：四川科学技术出版社，194-201.]

Deng B, Zhang WZ. 1998. Progress of study on insulin resistive mechanism [J]. *Medical Recapitulate*, **4** (2): 67-70. [邓　兵，张维忠. 1998. 胰岛素抵抗机制研究进展. 医学综述，**4** (2): 67-70.]

Ding WM, Lan GZ. 2001. Progress of study on epidermal growth factor [J]. *China Feed*, **20** (6): 20-23. [丁文明，兰恭赞. 2001. 表皮生长因子研究进展. 中国饲料，**20** (6): 20-23.]

Feng WH, Hu TQ, Bi FZ, Cui YT, He GX, Ye ZY. 1991. A study on the endangering causes of giant panda [A]. In: A study on bredding and disease of the giant panda [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Publishing Limited, 23-29. [冯文和，胡铁卿，毕凤洲，崔扬稻，何光昕，叶志勇. 1991. 大熊猫濒危原因分析. 见：大熊猫繁殖与疾病研究. 成都：四川科学技术出版社，23-29.]

Gianetto BO, Griswold MD. 1979. Hormone-supplemented medium enhances androgen binding protein secretion in sertoil cell culture [J]. *Horm Meteb Res*, **11** (5): 1-84.

Gilmore GA, McGann LE, Ashworth E. 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking [J]. *Animal Reproduction Science*, **53** (1-4): 277-297.

Han ZM, Chen DY, Li JS, Sun QY, Wang PY, Huang Y, Du J. 2001. The culture of fibroblasts from diaphragm of giant panda [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **37** (10): 644-648.

Hou GH, Jiang ZY, Li XK, Xu JT, Lin C. 2002. Effects of EGF, bFGF, TGF-β1 on the proliferation of cultured chicken limbal epithelial cell [J]. *Chinese Journal of Practical Ophthalmology*, **20** (11): 368-370. [侯光辉，江振友，李校坤，徐锦堂，林晨. 2002. EGF、bFGE、TGF-β1对培养鸡角膜缘上皮细胞增殖性的影响. 中国实用眼科杂志，**20** (11): 368-370.]

Liu JL, Chen YC, Sun QY, Song XF, Chen DY. 1999. Culture of skeletal muscle cells from giant panda [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35** (10): 553-556.

Lü Y, Zhang HY, Liu XY, Li HW. 2002. Effects of EGF on proliferation and alkaline phosphatase expression of human periodontal ligament cells [J]. *J of Capital Medical University*, **23** (2): 171-173. [吕　婴，张海燕，刘晓勇，李红卫. 2002. EGF对人牙周膜细胞增生与ALP活性表达的影响. 首都医科大学学报，**23** (2): 171-173.]

Martha S. 1984. Growth of human mammary epithelial cells in mono-layer culture [A]. In: David WB, David AS, Groden HS. Cell culture methods for molecular and cell biology. Vol.2: Methods for Serum-free culture of cells of the endocrine system [M]. New York: Alan R Liss Inc.

Panelman JJ, Nicolson M, Pepose JS. 1990. Epidermal growth factor in human aqueous humor [J]. *J Opnihal Mol*, **109**: 1903-1909.

Ray DB, Horst IA, Jansen RW, Mills NC, Kowal J. 1981. Normal mammary cells in long term culture Ⅱ. prolactin, coticosterone, insulin and triiodothyronine effects on alpha-lactalbumin production [J]. *Endocrinology*, **108** (2): 584-590.

Song D, Fang XB. 2002. Progress of study on epidermal growth factor [J]. *Progress of Anatomical Science*, **8** (4): 339-342. [宋丹，方秀斌. 2002. 表皮生长因子的研究进展. 解剖科学进展，**8** (4): 339-342.]

Wang JL, Liu Y, Jin Y, Lü HB, Zhao Y, Wang XW, Dong X. 2002. Effects of EGF on the cell cycle in dermal fibroblasts of SD rat [J]. *J of the Fourth Military Medical University*, **23** (10): 935-938. [王军琳，刘　源，金　岩，吕红兵，赵　宇，王新文，董　芯. 2002. EGF对真皮成纤维细胞中cyclinD和CDK-4表达的影响. 第四军医大学学报，**23** (10): 935-938.]

Wang MH, Lin YS, Zheng JR, Chen JQ, Sun MX. 2001. The study on effects of rhEGF on proliferation of human conjunctival epithelial cells [J]. *Eye Science*, **17** (2): 118-121. [王敏华，林跃生，郑健揉，陈家琪，孙明霞. 2001. rhEGF促进人结膜上皮细胞增值的实验研究. 眼科学报，**17** (2): 118-121.]

Wang YP, Cheng ZY. 1989. Speciman preparation of mouse fibroblast metaphase chromosome and G-banded analysis [J]. *Heredita*, **11** (1): 21-23. [王一平，程在玉. 1989. 小鼠成纤维细胞中期染色体标本制备及G带核型分析. 遗传，**11** (1): 21-23.]

Zhang DL, Li LJ, Xia GT, He XY, Gao BX, Bai XH, Huang GS, Liu SG, Yan LF, Fang FD, Hu CL, Wang LJ, Jiang HH, Feng AM, Zhang GM, An SG, Reng YQ, Guo JM, Hu SX, Fan JX, Niu YL, Song ZJ, Li Y, Fan SJ. 2001. Analysis of chromosomal karyotypes and cytogenetic variations of animal cell lines [J]. *Acta Genetica Sinica*, **28** (4): 327-344. [张德礼，李六金，夏耕田，何旭玉，高步先，白晓鸿，黄高升，刘尚高，阎隆飞，方福德，胡春雷，王黎军，姜焕宏，冯阿曼，张广民，安社刚，任远强，郭建民，胡淑贤，樊军喜，牛永利，宋占军，李迎，樊胜军. 2001. 动物细胞系的染色体组型与遗传变异率的分析. 遗传学报，**28** (4): 327-344.]

Zhu WY. 1997. Progess of study on insulin [J]. *Bulletin of Biology*, **32** (12): 2-4. [朱文玉. 1997. 胰岛素研究的进展. 生物学通报，**32** (12): 2-4.]